



B5D

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 62237348 A

(43) Date of publication of application: 17.10.87

(51) Int. Cl.

G01N 27/30
G01N 27/46

(21) Application number: 81079268

(22) Date of filing: 08.04.86

(71) Applicant: NOK CORP MORIZUMI TOYOE

(72) Inventor: MORIZUMI TOYOE
TAKATSU ICHIRO

(54) PRODUCTION OF ENZYME SENSOR

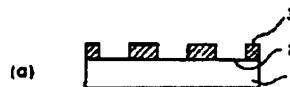
above-mentioned manner.

(57) Abstract:

COPYRIGHT: (C)1987,JPO&Japio

PURPOSE: To effectively produce a sensor by forming two sets of combined electrodes of anode electrode and cathode electrodes consisting of thin metallic films on the same insulating substrate and forming a deactivated enzyme immobilized film thereto.

CONSTITUTION: A positive type photoresist 3 is patterned on the substrate 1 in such a manner that the electrode parts are formed within the range of an exposed substrate surface 2. A thin chromium film 4 and thin gold or platinum film 5 are successively formed on the substrate 1 by a vacuum deposition method. The entire part is thereafter immersed in a resist stripping soln. to remove the resist. The thin film 5 remaining on the exposed surface is used as the electrode surface. The three electrodes to be used as the anode electrode and cathode electrode consisting of the thin metallic film are thus formed in the state of commonly using one cathode electrode at the prescribed point on the substrate 1. The enzyme immobilized film is installed to at least one electrode to be used as the anode electrode. The sensor is produced in the



⑫ 公開特許公報(A)

昭62-237348

⑪ Int.Cl.⁴G 01 N 27/30
27/46

識別記号

庁内整理番号

J-7363-2G
A-7363-2G

⑬ 公開 昭和62年(1987)10月17日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑭ 発明の名称 酵素センサーの製造方法

⑮ 特 願 昭61-79268

⑯ 出 願 昭61(1986)4月8日

⑰ 発 明 者 森 泉 豊 栄 東京都世田谷区奥沢3-22-6
⑱ 発 明 者 高 津 一 郎 横浜市戸塚区汲沢1-23-5
⑲ 出 願 人 エヌオーケー株式会社 東京都港区芝大門1丁目12番15号
⑳ 出 願 人 森 泉 豊 栄 東京都世田谷区奥沢3-22-6
㉑ 代 理 人 弁理士 吉田 俊夫

明 細 書

1 発明の名称

酵素センサーの製造方法

2 特許請求の範囲

1. 同一絶縁基板上に金属薄膜よりなるアノード電極およびカソード電極の組合せ電極を2組形成させ、各組合せ電極において少なくともアノード電極上に酵素固定化膜を固定化させた後、参照側電極を形成する電極上の酵素固定化膜に紫外線を照射し、失活酵素固定化膜を形成させることを特徴とする酵素センサーの製造方法。

2. 固定化が光架橋重合体によって行われる特許請求の範囲第1項記載の酵素センサーの製造方法。

3. カソード電極1個が2組の組合せ電極に共通して用いられる特許請求の範囲第1項記載の酵素センサーの製造方法。

4. 組合せ電極が過酸化水素電極を構成する特許請求の範囲第1項記載の酵素センサーの製造方法。

3 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、酵素センサーの製造方法に関する。更に詳しくは、絶縁基板上に信頼性の高い過酸化水素電極を形成せしめることのできる酵素センサーの製造方法に関する。

(従来の技術)

最近、酵素反応や免疫反応などの生体反応を利用した種々のバイオセンサーが開発されており、特に臨床分野では、更に小型、高性能で低価格なものが求められるようになってきている。酵素センサーは、こうしたバイオセンサーの一種であり、例えばグルコースオキシダーゼの触媒作用を利用したグルコースセンサーは、血液や尿中のグルコース濃度を測定するのに用いられ、実用的には糖尿病患者に対する臨床検査用として重要である。

しかしながら、こういった酵素センサーで実用化され、市販されているものの大半は、電極と酵素固定化膜とが一体構造となっていないため、小型化の達成および大量生産による低コスト化の妨

げとなっている。

(発明が解決しようとする問題点)

こうした市販酵素センサーの問題点に鑑み、最近では電極上に直接酵素を固定化させる研究が進められ、それに伴ってかなり小型化されたものが開発されるようになってきている。しかしながら、同一基板上に多数個のセンサーを同時に形成させ、大量生産を可能とせんとする場合には、例えば外部電極との接続部を露出させ、検出部のみに酵素を固定化するというように、電極基板上的に必要な部分のみに酵素を固定化させる必要がある。

本発明者らは、こうした課題を解決するために、光架橋重合体を用いて酵素固定化膜を形成せしめることが有効であることを見出し、絶縁基板上に形成させた金属薄膜よりなるアノード電極およびカソード電極の少くとも前者の電極に、光架橋重合体で固定化された酵素固定化膜を設置した酵素センサーを先にまず提案している (特願昭60-103,699号)。

このように構成された酵素センサーは、同一基

およびカソード電極の組合せ電極2組の内の1組について、少くともアノード電極上に固定化された酵素固定化膜を設置してなる。1組の組合せ電極上への酵素固定化膜の固定化は、一般に光架橋重合体によって行われ、その光架橋重合体で固定化される酵素固定化膜の形成は、先の提案と同様に、光架橋性重合体と酵素との水性混合物にフォトリソグラフ法を適用することによって行われる。

また、酵素固定化膜を設置しない他の1組の組合せ電極は、少くともアノード電極上が光架橋重合体膜によって被覆されて用いられるが、この場合の光架橋重合体膜の形成も、光架橋性重合体を含む水溶液にフォトリソグラフ法を適用することによって行われる。

これら2組の組合せ電極において、各組毎にアノード電極およびカソード電極を形成させてもよいが、カソード電極を2組の組合せ電極について共通して用いられる1個のカソード電極とし、それを各組合せ電極毎に切換えて用いるようにすることもできる。

板上に多数個の微小なセンサーを同時に形成させることができ、大量生産を可能とさせるが、形成された1個の組合せ電極が過酸化水素電極を構成する場合には、この電極が過酸化水素以外の還元性妨害物質にも感応してしまうという問題のあることが見出された。

通常、こうした問題の対策としては、酵素固定化膜と電極面との間に過酸化水素選択透過膜を設置する方法がとられているが、上記酵素センサーの場合には、電極面上に直接酵素が固定化されているため選択透過膜の設置は不可能である。

そこで、本発明者らは、かかる課題の新たな解決方法を求めて種々検討の結果、同一基板上に2組の組合せ電極を形成させ、その内の1組について、少くともアノード電極上に固定化された酵素固定化膜を形成させることにより、上記課題が有効に解決されることを先に見出した (特願昭60-171,850号)。

ここに提案された酵素センサーは、同一絶縁基板上に形成させた金属薄膜よりなるアノード電極

酵素センサーの作製に際しては、まずガラス板、塩化ビニル樹脂、ポリイミド樹脂などの硬質樹脂板、 SiO_2 、 Si_3N_4 などの絶縁被膜を表面に形成させたシリコンウェハーなどの平らな絶縁基板上に、アノード電極およびカソード電極の組合せ電極2組を形成させることが行われる。電極の形成は、金、白金 (以上アノード電極用) または銀、金、白金 (以上カソード電極用) などの金属材料を用い、図面の第1図に示されるようなリフトオフ法、基板上に蒸着された金属薄膜をエッチング除去してパターニングするフォトエッチング法、電極形状の窓が開いたマスクを基板上に重ね、マスクごしに電極形成物質を蒸着させるマスク蒸着法、電極形成物質を導電材料とする導電性塗料を電極形状に印刷するスクリーン印刷法あるいは上記フォトエッチング法またはマスク蒸着法において蒸着の代りに電極形成材料の無電解メッキを行なうメッキ法などによって行なうことができる。

第1図に示された態様では、リフトオフ法が用いられている。まず、清浄された平らな絶縁基板、

例えばガラス板1上に電極部が基板露出面2の範囲内に形成されるように、ポジ型フォトリソスト3をパターニングする(工程a)。次いで、真空蒸着法により、この基板上にクロム薄膜4(厚さ約500Å)および金または白金薄膜5(厚さ約0.2μm)を順次形成させる。ここで、クロム薄膜は、電極を形成する金または白金薄膜とガラス板基板との密着性を高めるために設けられている(工程b)。その後、全体をアセトンなどのレジスト剥離液中に浸漬してレジストを除去し、基板露出面2に残存する蒸着薄膜5を電極面とした(工程c)。

このようにして絶縁基板上の所定の個所に、カソード電極が1個共通して用いられる態様で、金属薄膜よりなるアノード電極およびカソード電極となる3個の電極を形成させたら、その内の少くともアノード電極となる1個の電極に酵素固定化膜を設置させるが、その設置はフォトリソグラフ法を用いて、例えば第2図に示される如くに行なわれる。

まず、第1図に示された如くにして形成された

絶縁基板2上の電極面5に、光架橋性重合体と酵素との水性混合物をスピンコート法、スプレー法などにより均一にコーティング6する(工程d)。光架橋性重合体としては、それが酵素水溶液と共に水性混合物として分散されるため一般に水溶性重合体を用いられ、例えば分子中に光架橋性基としてスチルバゾリウム基、ジアゾ基などの感光性基、好ましくはスチルバゾリウム基を有するポリビニルアルコールなどが水溶液として用いられる。水性混合物は、上記光架橋性重合体水溶液(濃度8.5~12重量%)1gに対して、酵素3~72mgを蒸留水0.8mlに溶解させた酵素水溶液が添加され、それを数分間程度攪拌、混合してコーティングに用いられる。

コーティング液を絶縁基板上の電極面上にコーティングし、それが自然乾燥したら、そこをネガまたはポジの画像を有するフォトマスク7で覆い、紫外線照射して光架橋性重合体を光架橋させ、未架橋部分を純水で溶去して、光架橋部分に光架橋重合体で固定化された酵素固定化膜8を形成させ

る(工程e)。これを再度紫外線照射してから乾燥させた。ここで使用されるフォトマスクは、2組の組合せ電極の内の1組のアノード電極11にのみ、酵素固定化膜8が形成されるような画像を有するものが用いられる。

次に、還元性妨害物質に対する2組の組合せ電極の感応特性を等しくするため、酵素固定化膜を設置しない他の1組の組合せ電極のアノード電極12に、第2図と同様の手法により、光架橋性重合体を含有する水溶液にフォトリソグラフ法を適用し、そこに光架橋重合体膜9を被覆させ、これを参照電極とした(工程f)。

これを再度紫外線照射してから乾燥し、各素子毎に分割して、その電極露出面5、5'、5'にリード線10、10'、10'を取り付ける。このようにして作製された酵素センサーの一態様が、平面図として第3図に示されている。また、第4~5図には、他の態様の酵素センサーの平面図が示されており、第4図の態様では、電極面5'から2本のカソード電極13、13'を延長して形成させ、

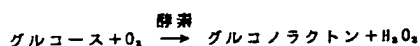
各アノード-カソード間の電極間距離を短縮させると共に、これらの各組合せ電極がそれぞれ酵素固定化膜8および光架橋重合体膜9で覆われており、また第5図の態様では、カソード電極13の面積を電極11、12の面積より広く設定することにより、アノードに対するカソード電流を安定にし、また電極間距離を一定にしたまま両電極間の対向幅を長くすることにより、電極の応答特性の向上が図られている。

この酵素センサーによって検出可能な基質とこの基質に対して反応する触媒としての酵素との組合せの例は次の如くであり、これらの場合両電極は過酸化水素電極として作用する。

被検出物質	酵 素
グルコース	グルコースオキシダーゼ
ガラクトース	ガラクトースオキシダーゼ
L-アミノ酸	L-アミノ酸オキシダーゼ
エタノール	アルコールオキシダーゼ
リン脂質	ホスホリパーゼ
コリン	コリンオキシダーゼ

グリセリン	グリセロキナーゼ
(2種類の酵素 を同時固定)	L-α-グリセロ-3-リン酸 オキシダーゼ

このような酵素センサーをグルコースセンサーとして用いた場合には、次のように作用する。まず、グルコースセンサーをグルコースを含まない緩衝液中に浸漬し、電極面に、例えば金電極の場合0.8Vの電圧を印加しておき、これにグルコースを添加すると、酵素が固定化された方の過酸化水素電極側で、グルコースがグルコースオキシダーゼ酵素固定化膜に拡散し、固定化酵素の触媒作用により次のように反応する。



この反応に伴って発生する過酸化水素は、アノード電極上で次のように酸化され、発生した過酸化水素量に比例した電流、即ちグルコース濃度に比例した電流が流れる。



このとき、参照側電極には酵素が固定化されていないため、酵素反応による電流は流れないので、

ものとし、これによって差動出力をより正確に検出する手段を求めて更に検討した結果、参照側となる膜状体にも失活酵素を固定化せしめる方法がきわめて有効であることを見出した(特願昭60-217,149号)。

この酵素センサーは、同一絶縁基板上に金属薄膜よりなるアノード電極およびカソード電極の組合せ電極を2組形成させ、その1組には少くともアノード電極上に固定化された酵素固定化膜を、他の1組には少くともアノード電極上に固定化された失活酵素固定化膜をそれぞれ設置して構成されている。

かかる酵素センサーの作製は、上記で図面の第1～2図を用いて説明した方法において、工程(d)で用いられた光架橋性重合体含有酵素水溶液をオープン中で酵素の種類に応じて約80～100℃で約5～10分間程度加熱し、酵素を失活させた水溶液が工程(f)で用いられる以外は、同様の方法によって行われる。そして、例えば第3～5図に示される態様において、符号8側に酵素固定化膜

酵素固定化側と参照側との差動出力を検出しても、酵素固定化側の電流のみを検出することができる。この場合に、試料液中にL-アスコルビン酸などの還元性妨害物質が含まれていても、妨害物質は固定化酵素の有無によらず、両方の組合せ電極で等しく酸化されるので、このときにこれら両電極を流れる電流の差動出力を検出すれば、妨害物質に起因する電流値分が相殺され、酵素反応に起因する電流値のみを検出することができ、例えばL-アスコルビン酸の場合、その濃度が0.5～4mg/dlの範囲内では、両電極で発生する妨害物質に起因する電流を3%以下に軽減できることが確認された。

しかるに、酵素固定化膜と参照側となる光架橋重合体膜とを光学顕微鏡で観察すると、光架橋重合体膜が透明でかつ均質な膜状体を形成しているのに対し、酵素固定化膜の方は白色で、その表面に微小な凹凸が無数に形成されていることが判明した。

そこで、これら両者の膜状体をなるべく同等な

が、また符号9側に失活酵素固定化膜がそれぞれ固定化された酵素センサーが得られる。

このようにして行なわれる酵素センサーの作製では、他の1組の組合せ電極の少なくともアノード電極上に固定化せしめる失活酵素固定化膜の形成が、上述の如く光架橋性重合体含有酵素水溶液を加熱処理し、酵素を失活させた水溶液として用いることにより行なわれている。

作製された酵素センサーは、参照側にも失活酵素を固定化させることにより、参照側電極の膜質を酵素側電極の膜質と等しくさせ、これによって2組の組合せ電極間の妨害物質に対する応答特性を等しくし、妨害物質信号の差動除去特性を一層改善させる。具体的には、L-アスコルビン酸を用いた妨害物質信号の差動除去特性の測定では、その濃度が1～100mg/dlの範囲内では、両電極で発生する妨害物質に起因する電流を2%以下に軽減することができ、この前の提案の0.5～4mg/dlの範囲内で3%以下という濃度範囲および電流値と比較して、妨害物質信号の差動除去特性のおお一層の

改善を達成させる。また、このような特性は、妨害物質が L-アスコルビン酸の場合だけではなく、尿酸などの 合にも同様に有効に発揮される。

このように、この酵素センサーは効果上では十分に所期の目的が達せられるものの、酵素固定化膜および失活酵素固定化膜をそれぞれ別個に形成させるために、2回のフォトリソグラフ法を適用しなければならず、しかも酵素固定化膜の形成に必要な量と同量の酵素を失活酵素固定化膜の形成時にも用いなければならないという製造上の無駄がみられる。

本発明は、かかる無駄を省いた酵素センサーの製造方法を提供せんとするものである。

〔問題を解決するための手段〕

従って、本発明は酵素センサーの製造方法に係り、酵素センサーの製造は、同一絶縁基板上に金属薄膜よりなるアノード電極およびカソード電極の組合せ電極を2組形成させ、各組合せ電極において少なくともアノード電極上に酵素固定化膜を固定化させた後、参照側電極を形成する電極上の

酵素固定化膜に紫外線を照射し、失活酵素固定化膜を形成させることにより行なわれる。

2組の組合せ電極の少なくともアノード電極上に酵素固定化膜を形成させることは、上記で図面の第1～2図を用いて説明した方法において、工程(e)において画像を有するフォトマスクを用いることなく、あるいは2組のアノード電極が露光されるような画像パターンを有するフォトマスクを用いて、紫外線照射することにより行なわれる。この紫外線照射に用いられる紫外線は、水銀ランプから発せられるような比較的長波長のものであり、これを約30秒間程度照射した場合には、光架橋性重合体の光架橋は行なわれるものの、酵素への影響は殆どみられない。

その後、参照側電極となる方の組合せ電極上の酵素固定化膜のみにフォトマスクなどを用いて紫外線を照射し、一旦固定化させた酵素を失活させる。この場合の紫外線照射条件は、一般的に次の如くである。

光源：短波長用紫外線ランプ

波長：約2000～3000Å

出力：約10～20W/cm²

距離：約1～5cm

時間：約1～5分間

〔発明の効果〕

本発明方法により、次のような効果が奏せられる。

(1) 酵素センサーの電極上に酵素固定化膜および失活酵素固定化膜を形成させるためのフォトリソグラフ法の適用が一回で行なわれる。

(2) これに関連して、これら両固定化膜の膜厚膜質などが同等のものとなるため、妨害物質に対する差動除去特性が向上する。

(3) 使用される酵素量が熱失活法の半分で済む。

〔実施例〕

次に、実施例について本発明を説明する。

実施例1

光架橋性ポリビニルアルコール(光架橋性ステルパゾリウム基含有量1.4モル%、けん化度88%、

重合度1400)の11.7重量%水溶液0.5gに、グルコースオキシダーゼ酵素30mgを溶解させた蒸留水0.4mlを添加し、数分間程度攪拌、混合してコーティング液を調製する。このコーティング液を、ガラス板上に形成させた2組の過酸化水素電極の上に、4000rpm、20秒間の条件下でスピンコートする。コーティング液が自然乾燥したら、2組の過酸化水素電極の内、それぞれアノード電極部分のみを紫外線照射できるようなネガの画像を有するフォトマスクで覆い、紫外線照射(出力250W)を15秒間行ない、その後純水による洗浄によって現像し、再び紫外線照射して乾燥させた。

次に、参照側電極のアノード電極部分にのみ紫外線が照射されるようなネガ画像を有する石英製フォトマスクで覆い、殺菌用紫外線ランプ(波長2537Å)を用いて、照射距離2cm、照射時間2分間の条件下で紫外線照射を行ない、このアノード電極上の固定化膜に固定されている酵素を失活させた。

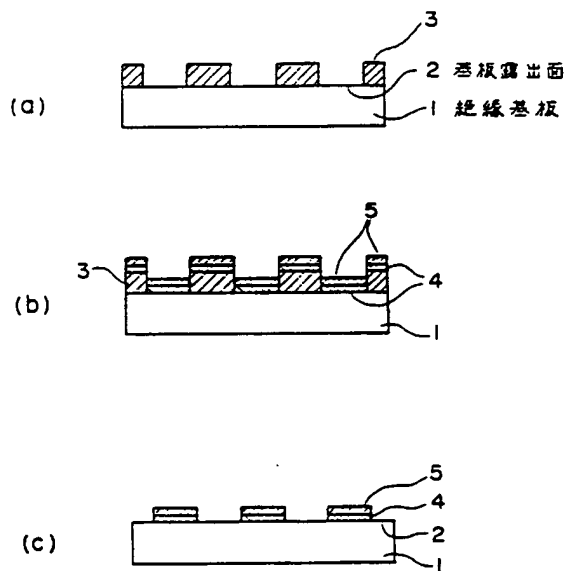
4 図面の簡単な説明

第1図は、絶縁基板上に電極を形成させる工程を順次示した断面図である。第2図は先に提案された方法を示しており、絶縁基板上に形成させた2個のアノード電極の上に、それぞれ光架橋重合体で固定化された酵素固定化膜および光架橋重合体膜(または失活酵素固定化膜)を設置させる工程を順次示した断面図であり、第3図はこのようにして作製された酵素センサーの一層様の平面図である。第4～5図は、酵素センサーの他の層様の平面図である。

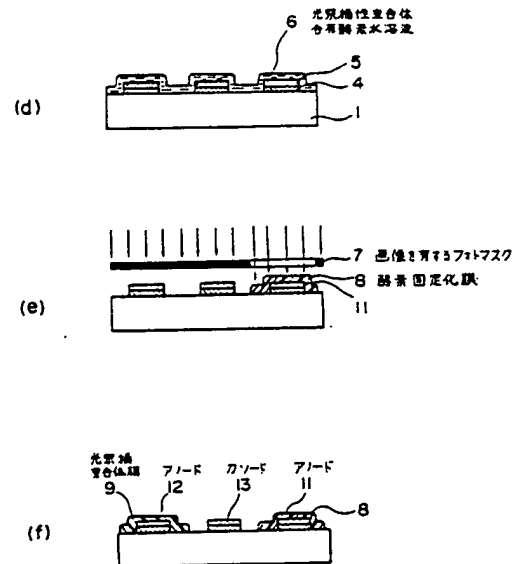
(符号の説明)

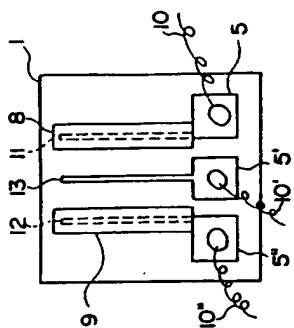
- 1.....絶縁基板
- 2.....基板露出面
- 5.....電極
- 6.....光架橋性重合体含有酵素水溶液
- 7.....画像を有するフォトリソマスク
- 8.....酵素固定化膜
- 9.....光架橋重合体膜
(または失活酵素固定化膜)
- 11.....酵素固定化膜側アノード電極
- 12.....参照側アノード電極

第1図

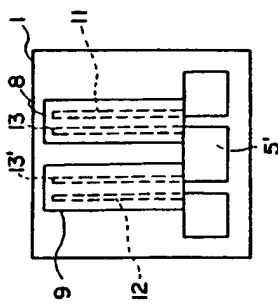


第2図

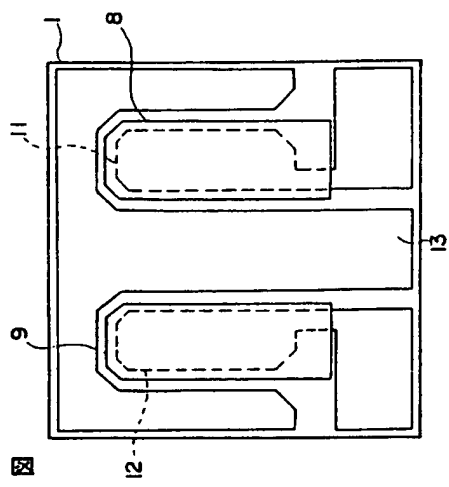




第 3 図



第 4 図



第 5 図